TOYOBO
Ideas & Chemistry

14-04

研究用試薬

MATREX™

3次元組織モデル

LDM（Living Dermal Model）

TMLDM-001

取扱説明書

ご使用の際には、必ずお読み下さい。

A4096K

このたびは、MATREX™（マトレックス）をお買い上げ頂きありがとうございます。
皆様の研究・評価試験に有効にお使い頂くために、本取扱説明書をお読みください。

■ 製品内容

（1） 1セットに含まれるもの

・組織トレイ（6個入り）	1枚
・アッセイトレイ（6穴）	1枚
・アッセイリング	6個
・LDMアッセイ培地	100ml x 2本
・シリコンチューブ	1本

（2） 内容の説明

(1) 組織トレイ（下図参照）

組織は、トランスウェルのポリカーボネート膜上に張り付いた状態でのっており、1トレイあたり6個のトランスウェル（組織）が入っています。組織は、通常ポリカーボネート膜に張り付いた状態（トランスウェルのまま）で使用します。組織をポリカーボネート膜から剥がす必要はありません。
トランスウェルは、寒天培地上にのせられた状態で送付されます。

(2) アッセイトレイ

6穴の培養用プレートです。通常の実験では、組織トレイから組織含トランスウェル（以下：トランスウェル）を取り出し、このアッセイトレイに移して使用します。

(3) アッセイリング

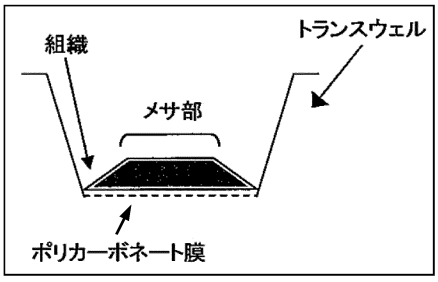
被験物を添加する時に用います。リングの直径は、10mmです。アッセイリングの適用により暴露面積を一定にすることができます。アッセイリングの中央部への適用量は、最小80μl、最大200μlまでになります。

(4) シリコンチューブ

アッセイリングを組織表面に接着させるときに使用します。

(5) LDMアッセイ培地

実験するときに使用する培地です。



*)メサ部：組織の頂上部を示し、その部分は、組織の厚み等が一定のところになります。薬物などの添加は、このメサ部に対し行うことになります。アッセイリングを用いた場合、アッセイリング内部がこのメサ部に相当します。

■製品の受け入れ

(1)お受け取り後のチェック

お受け取り後、直ちに開封し、液漏れ、組織トレイ内の寒天培地の色調、LDMアッセイ培地の濁り、破損についてチェックしてください。組織トレイ内の寒天培地の色調については、送付時に添付しております培地pHチャートを参考にチェックしてください。

組織トレイ、LDMアッセイ培地については、必ず使用期限をご確認ください。

万が一、問題があった場合は、直ちに下記までご連絡ください。

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部

(06)6348－3786

(2)保存と有効期限

・組織トレイは、お受け取り後、輸送用発泡スチロール箱から取り出し、20～37℃(好ましくは約30℃)のインキュベーター等で、包装形状または20～30℃室内では発泡スチロール内で室温で保存してください。使用期限は、組織トレイに記載しております。使用期限内にご使用ください。

・LDMアッセイ培地は、冷蔵(4℃)に保存してください。使用期限は、培地ラベルに記載されております。

・アッセイトレイ、アッセイリング、シリコンチューブは、室温に保存してください。

■実験道具と環境

(1)実験室

アッセイ培地には抗生物質が含まれるため、24時間程度の被験暴露、または培養時間でのご使用の場合、クリーンベンチ等で使用する必要はありません。埃、粉塵等が多い場所を除き、通常の実験室内で行えます。但し、3～4日にわたる培養実験の場合は、通常の細胞培養実験と同様に無菌操作でご使用ください。

(2)インキュベーター

CO_2インキュベーター(設定温度:37℃)のご使用をお奨めします。

もしCO_2インキュベーターをお持ちでない場合は、通常のインキュベーター(37℃)に、蒸留水の入った容器をいれ、湿度を95%以上に保った状態で使用することで代用できます。

培地の蒸発乾燥を防止する目的です。

(3)吸光度測定機器

MTT試験を行う場合、96穴プレートリーダーをお使いください。

もし、お持ちでない場合は、マイクロセルを用いて分光光度計で測定してください。

(4)その他消耗品

LDMを用い、MTT試験を行う場合、下記の器具が必要となります。

ピンセット、ピペット類、栓付き小試験管(またはエッペンドルフチューブ)、バイオプシーパンチ(8mmφ)*、MTT試薬、酸性イソプロパノール(塩酸＋イソプロパノール)

＊バイオプシーパンチをご入用の際は、当社までお問い合わせください。

■使用方法

(1)トランスウェルの取り出し方

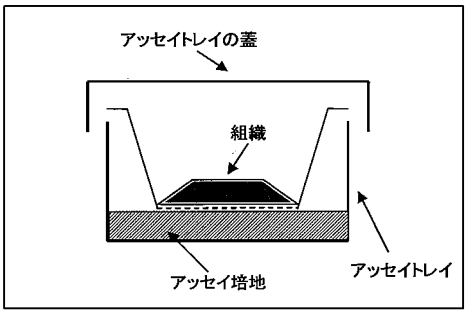
組織トレイの周囲のシールをはがし、蓋を開けます。ピンセット等を用いて、トランスウェルとアガロース培地の間に空気を入れるようにしてトランスウェルを取り出します。取り出したトランスウェルは、アッセイトレイに移します。

無菌的に組織を取り出すときは、組織トレイを、クリーンベンチに入れ同様の操作を行ってください。

(2)基本実験様式

アッセイトレイの各ウェルに、LDMアッセイ培地を1．2ml入れます。

通常、本モデルは組織上面を空気にさらした状態で使用します。



■MTT試験方法

LDM－001を用いて *in vitro* 刺激性試験を行う場合は以下の手順で行います。なお、本法は基本的な使用方法ですので、実験目的により種々変更を加えお使いいただけます。本法について別紙に図表入りで説明してありますので、ご参考にしてください。

①準備

(1)MTT培地：MTT反応前に用事調製します。

MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]を10mg量り取り、室温に戻したLDMアッセイ培地　30ml　に溶解します。終濃度は、0．333mg／mlとなります。MTTは黄色物質ですが、細胞内のミトコンドリア還元酵素により不溶性の青色ホルマザンが生成されます。生細胞が青色に発色することを利用して生存率を求めます。MTTは還元反応により発色するので、還元作用のある被検物の適用については洗浄を十分行うなどの特別な対応を行ってください。

(2)酸性イソプロパノール(抽出液)

イソプロパノール100ml　に濃塩酸(12N)を　0．333ml　加え混和させます。終濃度は0．04N塩酸－イソプロパノールとなります。

②実験操作

(1)アッセイトレイに移した組織（トランスウェル：以下LDM）のまわりに培地が残っている場合、パスツールピペットあるいは清潔な柔らかい紙等を用いて吸い取ります。
このとき、パスツールピペット等による組織の吸引または穴を開けることのないように注意してください。以下の操作のパスツールピペットによる吸引除去作業においても同様に注意して行ってください。

(2)室温に戻したLDMアッセイ培地5mlをトランスウェル内に分注して、アッセイトレイの蓋をした後、室温に静置します。これでLDM組織内に残存する輸送時の培地や老廃物の洗浄を行います。

(3)30分経過後、パスツールピペットなどを用いてLDM上面およびアッセイトレイのウェル内の培地を吸い取ります。もし、LDM組織がピンク懸かっている時は、さらに洗浄を15分程度追加して行ってください。

(4)LDMをアッセイトレイの蓋にのせます。

(5)次に、アッセイリングの片面にシリコンを薄く塗りLDM表面に接着させる作業をします。

(6)アッセイリングをピンセットを用いて取り出し、片面にシリコンチューブのシリコンを薄く連続的に塗ります。

(7)アッセイリングをシリコン塗布面を下にしてLDM表面中央に置きます。ピンセットなどを用いてアッセイリング上面を軽く押し付けてLDMに密着させます。
トランスウェルの底面から見て、シリコンの接着面が連続的になるように接着させます。このとき、余分のシリコンがリング中央部にはみ出さないように、気をつけて行ってください。試験に用いる被検物の性状によりリングを必要としない場合は、この操作は不要です。

(8)アッセイトレイの各ウェルに**LDMアッセイ培地　1．2ml** を入れます。

(9)アッセイリングを付けたLDMを、トランスウェル底面に気泡が入らないようにアッセイトレイに移します。

(10)被験物をアッセイリング中央部に必要量添加します。アッセイリングの中央部への適用量は、通常　**80～200μl**（固体の場合約　**80mg**）を使用します。不溶性物質の場合は、アッセイトレイを天秤の上にのせて一定重量を秤量することで適用することもできます。
通常、無処置対照群には、何も適用しないものを用いますが、被検物の溶剤として特別な溶媒を用いる場合は、使用される溶媒のみ添加したものを対照としてください。

(11)被験物を添加した後、アッセイトレイを37℃のCO_2インキュベーターに入れて薬剤暴露を行います。被験物による暴露は、EC50値を求める場合、通常　**16時間～24時間**　の間で行います。実験の再現性を得るために、一連の実験は、同じ暴露時間で行ってください。
ET50値を求める場合は、適当な暴露時間を設定してください。(例：4、8、12、16、24時間)

(12)被験物暴露後、アッセイリング内(　または組織表面に残存する被験物　)及びアッセイプレートの各ウェルの培地を吸引除去したのち、アッセイ培地で組織表面の**残存する被験物を洗い**

流します。クリームなどの被験物の場合、LDM表面の被験物が洗い流せない場合があります。この場合は、スパーテル等を用いて組織を傷つけないように被験物を除いたのち、再度洗浄を行います。洗浄操作で、アッセイリングが組織からはがれる場合がありますが、その際は、はずして、組織のみで以後の操作を行ってください。
被験物が簡単に洗い流せない場合は、ピペット以外に洗瓶・シリンジなどで勢いよくLDMアッセイ培地を吹き付けるようにしてください。

(13)その後、トランスウェル内に培地を3ml添加し、15～30分静置し、LDM組織内に残存する被験物の洗浄を行います。アッセイリングが浮く場合がありますが、この時もはずして以後の操作を行ってください。

(14)アッセイトレイ内、トランスウェル内の培地を吸引除去します。この際、アッセイトレイのウェルに被験物の残存が認められるときは、アッセイ培地等で洗浄除去してください。MTTは還元物質により疑陽性発色が出る場合があります。被験物が、MTTと反応する場合は、ウェルを十分に洗浄後使用するか、または、新しいアッセイトレイの使用をお奨めします。

(15)トランスウェルの下側に**MTT培地**　をアッセイトレイのウェルごとに　**1．2ml**　分注した後、37℃のCO_2インキュベーターで、**3～4時間**　インキュベートしMTT発色反応を行います。この場合、トランウェルの下側に気泡が残らないように注意してください。

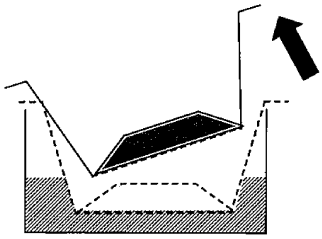
(16)MTT発色反応終了後、LDMの組織中央部(アッセイリング内側、被験物質暴露部)を、バイオプシーパンチ(8mmφ)を用いてポリカーボネートの**膜ごとくりぬき**、それぞれの切片を各1個ずつ栓付き小試験管(または1.5mlサンプリングチューブ)に入れていきます。

(17)その後、試験管に　**酸性イソプロパノール液**　を　**0．3ml**(分光光度計使用時は、最大1．0ml)加えます。切片が完全に浸かるようにしてくさい。**室温、暗所2時間　静置**により青色ホルマザンの抽出を行ってください。抽出時間は暗所で最高24時間まで可能です。

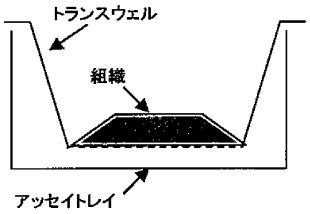
(18)抽出終了後、各試験管を攪拌し十分混和後、抽出されたホルマザンの**570nm(±30nm)の吸光度**を測定します。ブランクとしては、抽出に用いる酸性イソプロパノール液を用います。
刺激性の強い被験物等を用いた場合、組織角質が崩れ濁りを示すときがありますが、そのときは、抽出液を、3000rpm、10分遠心操作を行った後、その上澄みを用いて測定してください。
測定に96穴プレートリーダーを用いる場合は、**96穴プレート**に**抽出液**を**200μl**入れて測定します。分光光度計を使用するときは、マイクロセルを用いて測定してください。抽出液量は、マイクロセルの容量にもよりますが、最大1．0mlまで上げて行うことができます。

(19)生存率の算出
各被験物の吸光度測定値からブランク値を引いた値を算出します。
同じく、無処置対照の測定値からブランクの値を引いた値を算出し、この値を100%として、各被験物の生存率を算出します。

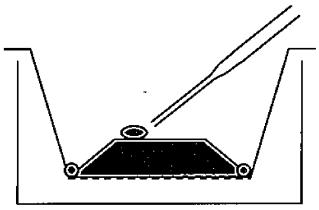
MTT試験方法



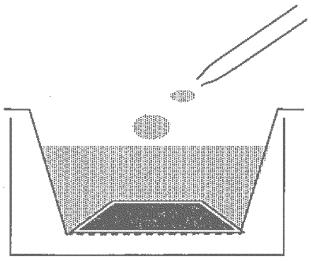
組織トレイの蓋を開け、トランスウェルの片側をピンセットなどを用いて図のように持ち上げ、トランスウェルを輸送用培地(寒天培地)から外します。



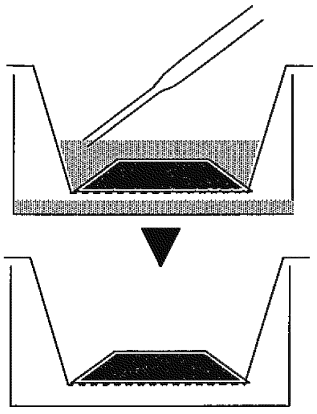
トランスウェルをアッセイトレイに移します。



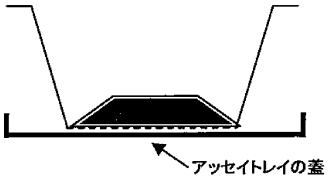
左図のように組織上に液体が残っている場合は、パスツールピペットあるいは柔らかい清潔な紙などで注意深く吸い取ってください。
注意:組織を吸わないように！！



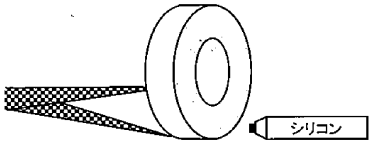
トランスウェルの内側に 5ml のアッセイ培地を入れます。



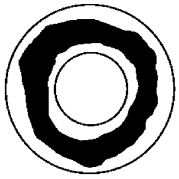
室温30分静置後、トランスウェル内側及び、LDMを透過したアッセイトレイ内のアッセイ培地を吸引除去します。



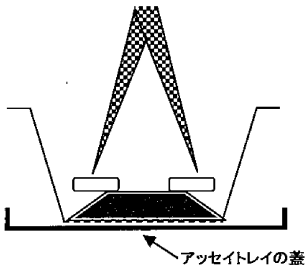
トランスウェルをアッセイトレイの蓋にのせます。



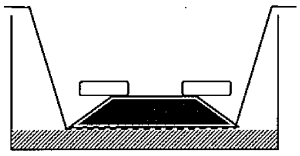
アッセイリングを取り出し、ピンセットでつまみアッセイリングの片面にシリコンを薄く塗っていきます。



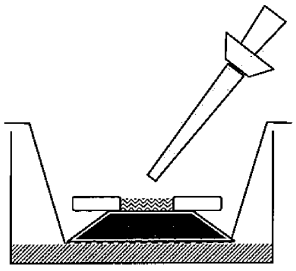
シリコン塗布は連続的になるようにします。



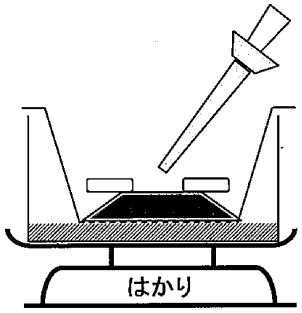
シリコン塗布面を下にしてLDM中央部にアッセイリングが位置するように取り付けます。ピンセットなどでアッセイリングの2点を垂直に押し付けます。押し付けるアッセイリングの箇所をかえながら、この操作を繰り返し接着させます。トランスウェルの裏から見て、シリコンが連続的になっていることを確認下さい。押し付ける際にリングをあまりずらさないように注意してください。また、強く押し付けるとLDM組織がつぶれることがあります。



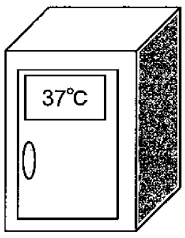
アッセイトレイにアッセイ培地、1．2mlを入れます。そこにアッセイリングをつけたLDMを移します。



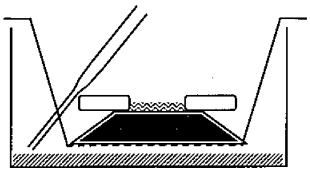
被験物添加は、溶液の場合シリコンリング中央へピペット等を用いて添加します。(80～200μl)



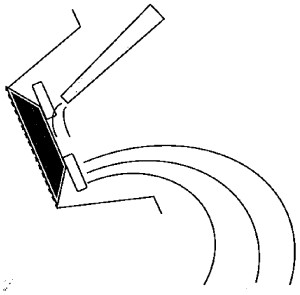
クリーム等で定量添加が困難な場合、アッセイトレイを秤の上に載せ重量で添加する事ができます。



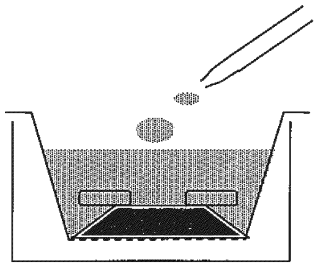
被験物　添加後、インキュベーターに入れます。



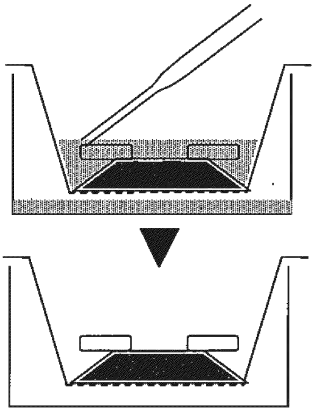
被験物暴露の終了後、アッセイ培地及びアッセイリング内に残存する被験物を吸引除去します。



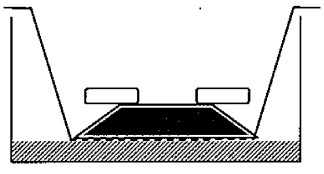
アッセイリング内に残存する被験物をアッセイ培地を吹きかけ除去します。(洗浄液はビーカー等に受けます。)
アッセイリングがはずれた場合は、アッセイリングを除いて操作を進めてください。



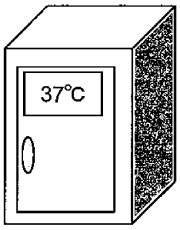
アッセイ培地　3ml　をトランスウェル内側に加え、15～30分間静置し、LDM内に残存する被験物を洗浄します。



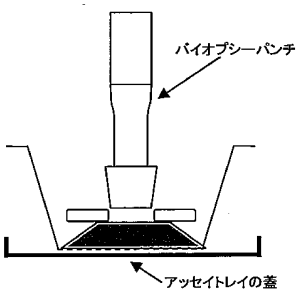
洗浄終了後、アッセイ培地をすべて吸引除去します。アッセイリングが浮いた場合は、アッセイリングを外して操作を進めてください。



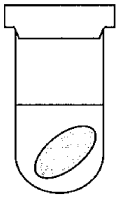
アッセイトレイに、MTT培地(MTTを溶解したアッセイ培地)を1．2ml入れます。



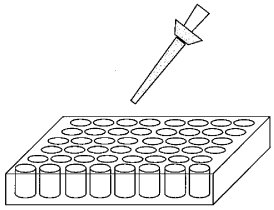
インキュベーターで3～4時間インキュベートし、MTT発色反応を行います。



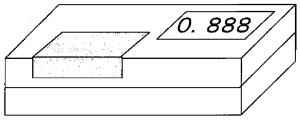
MTT発色反応後、組織中央部をアッセイリング内側に沿って8mmφバイオプシーパンチで切除します。(ポリカーボネート膜ごと切除します。)



組織片(ポリカーボネート膜ごと)をチューブに移し、300μlの酸性イソプロパノールを入れ青色ホルマザンの抽出を行います。
抽出時間は、室温、暗所2時間で行います。
抽出操作時、抽出液の蒸発を防ぐために、各試験管は栓をする必要があります。



抽出終了後、96穴プレートに抽出液を200μlずつ各ウェルに移します。



96穴プレートリーダーなどを用いて570nmの吸光度を測定します。

ご注意

・本品は、研究用に限定されていますので、ヒト又は動物へ適用すること、及び、*in vitro*診断に適用することは認められません。
・有害なウイルス等の感染は、既知の方法で検査しておりますが、ご使用に際しては、十分ご注意ください。
・該当製品のご使用によって起こった如何なる事故あるいは損害についても、当社は一切の責任を負わないことを、ご了解の上、ご使用ください。
・組織は、有限の寿命となっており、的確な実験を行って頂くためにも使用期限を守ってください。

■製造・販売元　　東洋紡株式会社
（大阪）ライフサイエンス事業部　〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
Tel:06-6348-3786　FAX:06-6348-3833
（東京）ライフサイエンス事業部　〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号住友商事京橋ビル
Tel:03-6887-8819　FAX:03-6887-8951